



Title 論文題目	Activation of the angiotensin II receptor promotes autophagy in renal proximal tubular cells and affords protection from ischemia/reperfusion injury. (アンジオテンシンII受容体活性化は近位尿細管のオートファジーを亢進し、虚血再灌流腎障害に対して保護的に働く)
Author(s) 著者	菅原, 浩仁
Degree number 学位記番号	甲第3131号
Degree name 学位の種類	博士(医学)
Issue Date 学位取得年月日	2021-03-31
Original Article 原著論文	J Pharmacol Sci. 2021 Feb;145(2):187-197
Doc URL	
DOI	10.1016/j.jphs.2020.12.001
Resource Version	Author Edition

学位論文の内容の要旨

報 告 番 号	甲第 1 4 9 8 号	氏 名	菅原 浩仁
<p><論文題名></p> <p>Activation of the angiotensin II receptor promotes autophagy in renal proximal tubular cells and affords protection from ischemia/reperfusion injury. (アンジオテンシン II 受容体活性化は近位尿細管のオートファジーを亢進し、虚血再灌流腎障害に対して保護的に働く)</p> <p><研究目的></p> <p>急性腎障害 (acute kidney injury: AKI) は手術後の患者や集中治療中の患者にしばしば発生し生命予後を悪化させるほか、慢性腎臓病へと進展するリスク因子となっている。しかし AKI の発症機序には虚血のほかに多岐に渡る因子が関与し、予防法や治療法は十分に確立されていない。</p> <p>腎臓の近位尿細管細胞では、虚血再灌流 (ischemia/reperfusion: I/R) 障害の際にオートファジーが亢進し、オートファジー抑制により I/R 腎障害が増悪することが報告されており、オートファジーは腎保護的に作用すると考えられている。当教室ではこれまで、SIRT1/AMP-activated protein kinase (AMPK)/ULK1 シグナルの抑制や mTORC1 シグナルの亢進によるオートファジー活性化障害が、2 型糖尿病における I/R 腎障害の増悪に関与していることを報告してきた。一方、レニン・アンジオテンシン系 (RAS) は腎オートファジーを亢進させることが報告されている。更に RAS 阻害薬投与が AKI の危険因子である可能性が報告されているが、I/R 腎障害におけるオートファジーと RAS の関連は明らかではない。</p> <p>本研究では、「腎近位尿細管においてアンジオテンシン II (Ang II) 受容体活性化によるオートファジー亢進が、I/R 腎障害に対し保護的に働く」という仮説を検証した。</p> <p><研究方法></p> <p>[実験 1] Ang II が腎オートファジーに及ぼす効果</p> <p>9～10 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラットを 2 群に分け、浸透圧ポンプを用いて、生理食塩水 (Vehicle) または Ang II (200 ng/kg/min) を 72 時間持続皮下投与した。投与開始 48 時間後からメタボリックケージを用いて 24 時間畜尿を行った。その後、テールカフ法にて血圧・心拍数を測定した後、麻酔下に頸動脈へカテーテルを挿入し直接血圧を測定後に採血、腎摘出を行った。腎重量、血液尿素窒素 (BUN)、血清クレアチニン (s-Cre)、尿蛋白を測定した。LC3 の蛍光免疫染色法を用いて腎組織のオートファゴソームを検出し定量した。</p>			

[実験 2] Ang II 前投与が I/R 腎障害および腎オートファジーに及ぼす効果

ラットを実験 1 と同様に Vehicle または Ang II を持続皮下投与し、薬剤投与開始 60 時間後から 12 時間絶食の後、麻酔下に右腎を摘出し、左腎動静脈をクランプして 30 分後に再灌流し、I/R 腎障害を作成した (Vehicle-I/R 群、Ang II-I/R 群)。対照として Vehicle 投与 sham 手術群 (Vehicle-sham 群) を作成した。その後、メタボリックケージを用いて畜尿を行った。再灌流 4 時間後または 24 時間後に、テールカフ法にて血圧・心拍数を測定し、麻酔下に採血、左腎摘出を行い、腎重量、BUN、s-Cre を測定した。腎組織は Periodic acid-Schiff (PAS) 染色を行い、急性尿細管壊死 (ATN) スコアを算出した。LC3 の蛍光免疫染色法によりオートファゴソームを検出し定量した。更にウェスタンブロット法により、オートファジー関連シグナル蛋白である LC3、p62、beclin-1 蛋白レベル、AMPK、ULK1、Akt、S6 のリン酸化を評価した。

[実験 3] Ang II 受容体拮抗薬が尿細管細胞のオートファジーに及ぼす効果

ラット近位尿細管細胞株である NRK-52E 細胞を 5%牛血清添加 DMEM 中で培養し、Vehicle または Ang II (1 μ M) を添加し、4 時間インキュベーション後に回収した。また、Vehicle または Ang II 添加 10 分前にオートファジー阻害薬 bafilomycin A1 (10 nM)、AT₁ 受容体阻害薬ロサルタン (1 μ M)、Mas 受容体阻害薬 A779 (1 μ M) を添加した。薬剤投与中は、Hanks' Balanced Salt solution 中で培養した。ウェスタンブロット法により、LC3 蛋白発現、AMPK、ULK1、Akt のリン酸化を評価した。

[実験 4] I/R および Ang II が Ang II 受容体発現に及ぼす効果

実験 2 のラット腎組織および実験 3 の NRK-52E 細胞を用いて AT_{1a} 受容体、AT₂ 受容体、Mas 受容体の mRNA レベルを RT-PCR 法で評価した。

<研究成績>

[実験 1] Vehicle 群、Ang II 群の比較では収縮期・拡張期・平均血圧、心拍数、腎重量/体重比、尿量、尿蛋白に有意差を認めなかった。Ang II 群では、Vehicle 群に比べ 10%の体重増加を認め、BUN (11.7 \pm 0.5 vs. 15.3 \pm 0.8 mg/dl)、s-Cre (0.22 \pm 0.01 vs. 0.27 \pm 0.02 mg/dl) が低下していた。Ang II 群で近位尿細管細胞における LC3 dot は 2.7 倍に増加し、Ang II によるオートファジー亢進が示された。オートファジー関連蛋白の検討では、Ang II 群で Akt の Ser473 リン酸化が軽度亢進していた。

[実験 2] Vehicle-sham 群、Vehicle-I/R 群、Ang II-I/R 群において、体重、収縮期・拡張期・平均血圧、心拍数は有意差を認めなかった。I/R 24 時間後で Vehicle-sham 群と比較して、Vehicle-I/R 群と Ang II-I/R 群で腎重量/体重比の増加を認めた。Vehicle-I/R 群では Vehicle-sham 群と比較して、BUN (123.3 \pm 4.4 vs. 16.5 \pm 2.2 mg/dl)、s-Cre (4.25 \pm 0.25 vs. 0.33 \pm 0.03 mg/dl) の上昇を認め、Ang II-I/R 群で BUN (99.2 \pm 6.0 mg/dl)、s-Cre (3.11 \pm 0.41 mg/dl) の上昇は部分的に抑制された。

Vehicle-I/R 群と比較して、Ang II-I/R 群で無尿率、ATN スコアは有意に低下していた。

近位尿細管細胞のオートファゴゾームは Ang II-I/R 群で Vehicle-I/R 群に比べ I/R 前で 7.5 倍、I/R 4 時間後で 2.5 倍に増加し、I/R 24 時間後には Vehicle-I/R 群のレベルまで低下した。LC3-II/LC3-I 比は両群とも I/R 4 時間後で最も高かった。p62 の蛋白レベルは両群とも I/R 24 時間で増加していたが、Ang II-I/R 群では増加の程度が小さかった。Beclin-1 の蛋白レベルと AMPK の Thr172 リン酸化は両群とも I/R による変化はみられなかった。オートファジーを亢進させる ULK1 の Ser555 リン酸化は、Ang II-I/R 群のみ I/R 4 時間後で亢進していた。Vehicle-I/R 群では I/R 4 時間で Akt と S6 のリン酸化が亢進し I/R 24 時間後では I/R 4 時間後と比較し低下していた。Ang II-I/R 群では I/R 4 時間の Akt と S6 のリン酸化亢進は Vehicle-I/R 群と比較し軽度であった。

[実験 3] NRK-52E 細胞に Ang II を添加すると LC3-II/LC3-I 比は上昇し、オートファジー阻害薬 bafilomycin A1 の添加により LC3-II 蛋白レベルが更に増加し、Ang II によりオートファジー活性が亢進することが示された。この効果は AT₁ 受容体拮抗薬 ロサルタンにより抑制されたが、Mas 受容体拮抗薬 A779 では抑制されなかった。Ang II 添加によりオートファジーを亢進させる ULK1 の Ser317 リン酸化は亢進したが、Akt と AMPK のリン酸化亢進は認められなかった。

[実験 4] Vehicle-I/R 群では Vehicle-sham 群に比較し AT₁ 受容体と Mas 受容体の mRNA 発現が低下していた。Ang II-I/R 群では両受容体とも Vehicle-sham 群と有意差は認めなかった。AT₂ 受容体 mRNA は 3 群とも検出されなかった。

NRK-52E 細胞では AT_{1a} 受容体と Mas 受容体が検出されたのに対し、AT₂ 受容体の発現は微量であり、Vehicle 群、Ang II 群ともにロサルタン添加によっても AT₂ 受容体の発現量は変化しなかった。

<考察>

本研究の実験成績から、ラットの I/R 腎障害モデルでは、非昇圧用量の Ang II 投与が近位尿細管細胞のオートファジーを亢進し、腎障害を有意に軽減することが示され、近位尿細管細胞株である NRK-52E 細胞では、Ang II が AT₁ 受容体を介してオートファジーを直接亢進させることが示された。これらの成績から、AT₁ 受容体活性化が近位尿細管細胞でのオートファジー活性化を介して I/R に対し保護的に働くことが示唆された。

心血管病や慢性腎臓病における RAS 阻害薬の臓器保護効果が確立している一方で、RAS の過度な抑制は AKI 発症につながることや、RAS 阻害薬内服が AKI の危険因子となることが報告されており、さらに近年では Ang II の投与が敗血症性ショックの患者に有用であることが報告されている。これらは AT₁ 受容体刺激の程度が各種病態に

よって異なる効果を及ぼすことを示唆している。本研究では非昇圧用量 Ang II の 72 時間前投与が I/R 腎障害を有意に軽減することを示した。

I/R により近位尿細管のオートファゴゾームと LC3-II/LC3-I 比が亢進したことは既報と一致している。I/R により Akt と S6 のリン酸化が亢進したことは、オートファジーを抑制する Akt-mTORC1 経路が I/R により活性化したことを反映しており、一方、AMPK と ULK1 のリン酸化には変化がなかったことから、本研究で用いたモデルにおける I/R によるオートファジー亢進は、Akt-mTORC1 や ULK1 シグナルの変化によるものではないと考えられる。I/R によるオートファジー亢進の機序についての詳細は不明だが、p53-sestrin-2 シグナルや HIF-1 α -BNIP3 シグナルの活性化、PINK/Parkin 系の関与を示唆する報告があり、本研究のモデルでも関与した可能性が考えられる。

Ang II は I/R 4 時間後の LC3 や p62 の蛋白レベルを変化させなかったことから、Ang II 群の I/R 4 時間後のオートファゴゾーム増加はオートファジー抑制の結果であることは否定的である。Ang II 群では I/R 4 時間後の ULK1 リン酸化が亢進し、AMPK のリン酸化に変化は見られなかった。NRK-52E 細胞でも Ang II は ULK1 のリン酸化を亢進し、オートファジーを亢進したが AMPK のリン酸化に変化はなかった。これらの結果は Ang II が AMPK とは独立して ULK1 を活性化させオートファジーを亢進することを示唆している。

Ang II 前投与により Vehicle で見られた I/R 4 時間後の Akt、S6 のリン酸化の亢進が軽減し、ULK1 の Ser555 リン酸化が亢進したことは、Ang II によるオートファジー亢進に ULK1 の活性化と Akt-mTORC1 シグナルの減弱が関与する可能性を示している。AT₁ 受容体活性化がどのようにして ULK1 のリン酸化を亢進させるのかは明らかではないが、近位尿細管細胞における AT₁ 受容体活性化による PKC- α 活性化、PKC- α による ULK1 リン酸化の報告からは、PKC- α の関与が考えられる。また DUSP1 欠損マウス線維芽細胞では ULK1 のリン酸化とオートファジーが亢進すること、AT₁ 受容体刺激により DUSP1 の蛋白レベルが減少することが報告されており、Ang II による ULK1 リン酸化亢進に、脱リン酸化の抑制も関与している可能性がある。

<結論>

非昇圧用量の Ang II は、腎尿細管細胞におけるオートファジーを亢進し、I/R 腎障害から腎を保護することが示された。Ang II が腎尿細管細胞のオートファジーを亢進させる機序には AT₁ 受容体を介した再灌流早期の ULK1 亢進と Akt-mTORC1 シグナル抑制が関与していると考えられた。

論文審査の要旨及び担当者

(令和3年3月31日授与)

報告番号	甲第1498号	氏 名	菅原 浩仁
論文審査 担 当 者	主査 循環器・腎臓・代謝内分泌内科学講座 教授 三浦 哲嗣	副査	薬理学講座 教授 堀尾 嘉幸
	副査 泌尿器科学講座 教授 舩森 直哉	委員	集中治療医学 教授 升田 好樹

論文題名	Activation of the angiotensin II receptor promotes autophagy in renal proximal tubular cells and affords protection from ischemia/reperfusion injury. アンジオテンシン II 受容体活性化は近位尿細管細胞のオートファジーを亢進させ、腎虚血再灌流障害に対して保護的に働く
結果の要旨 <p>腎臓の近位尿細管では、虚血再灌流（I/R）障害の際にオートファジーが亢進し、そのオートファジーの抑制は腎 I/R 障害を増悪させることが報告されている。アンジオテンシン(Ang) II は種々の腎病態に関与するペプチドだが、腎 I/R 障害時に Ang II がオートファジーとどのように関連しているのかは明らかではなかった。本研究では、尿細管細胞において Ang II 受容体活性化はオートファジーを亢進し、腎 I/R 障害に対し保護的に働くという仮説を設定しその検証を試みた。ラットの腎 I/R 障害モデルにおいて、非昇圧用量の Ang II 投与は I/R 後早期に ULK1 活性化と Akt/mTORC1 シグナルの抑制によってオートファジーを亢進させ、腎障害を軽減させることが示され、そのオートファジー亢進には近位尿細管細胞の AT₂ 受容体や Mas 受容体ではなく AT₁ 受容体の活性化が関与することが近位尿細管細胞株を用いた実験から確認され、本研究での仮説が支持された。</p> <p>本研究の成果は、腎 I/R 障害における Ang II 受容体とオートファジーの役割の一端を明らかにし、治療応用への基盤となる成績と考えられ、博士 (医学) の学位授与に値すると審査委員全員に評価された。</p>	